

日 本 国 特 許 庁

24.08.00

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

10/069251

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 8月24日

REC'D 13 OCT 2000

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第237003号

出 願 人

Applicant (s):

井上 圭三  
新井 洋由

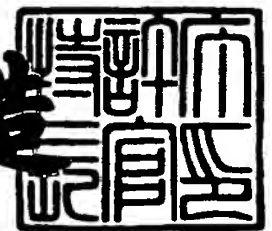
4

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3078615

【書類名】 特許願

【整理番号】 P99-0428

【提出日】 平成11年 8月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A01K 67/00

【発明の名称】  $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質遺伝子ノックアウト動物

【請求項の数】 13

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江東区越中島 1 丁目 3 番 関東財務局越中島住宅  
                            1 7 - 6 0 5 号

    【氏名】 井上 圭三

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都文京区小石川 5 - 3 5 - 8 - 6 0 4

    【氏名】 新井 洋由

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1 - 2 1 - 4 - 2 0 6

    【氏名】 有田 誠

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県三島市佐野見晴台 2 - 3 - 3

    【氏名】 寺社下 浩一

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 5 0 - 2 2

    【氏名】 鈴木 宏志

【特許出願人】

    【識別番号】 000118947

    【氏名又は名称】 井上 圭三

【特許出願人】

    【住所又は居所】 東京都文京区小石川 5 - 3 5 - 8 - 6 0 4

【氏名又は名称】 新井 洋由

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】

【識別番号】 100107870

【弁理士】

【氏名又は名称】 野村 健一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】  $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質遺伝子ノックアウト動物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】  $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物。

【請求項 2】  $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質をコードする内在性遺伝子の発現の抑制が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損によるものであることを特徴とする請求項 1 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 3】 非ヒト哺乳動物が、げっ歯類に属する動物であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 4】 げっ歯類に属する動物が、マウスであることを特徴とする請求項 3 に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項 5】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物から調製される非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 6】  $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化可能であることを特徴とする非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 7】  $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質をコードする内在性遺伝子の発現の抑制が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損によるものであることを特徴とする請求項 6 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 8】 非ヒト哺乳動物細胞が、げっ歯類に属する動物の細胞であることを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 9】 げっ歯類に属する動物の細胞が、マウス細胞であることを特徴とする請求項 8 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 10】 細胞が、胚性幹細胞であることを特徴とする請求項 5 から 9 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

【請求項 11】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) 請求項 6 から 10 に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚

に挿入し、キメラ胚を作製する工程、および

(b) 該キメラ胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

【請求項 12】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物又は請求項 5 から 10 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞を用いることを特徴とする医薬品のスクリーニング方法。

【請求項 13】 請求項 12 に記載のスクリーニング方法によって得られる医薬品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質（以下、「 $\alpha$ -TTP」という）遺伝子の発現が抑制されている哺乳動物に関する。ヒト  $\alpha$ -TTP 遺伝子は先天性ビタミン E 欠乏症の原因遺伝子であり、該哺乳動物は該疾患の治療法や治療薬開発のため、また酸化ストレスに基づく動脈硬化や糖尿病等の治療や治療薬開発のために利用されうる。

【0002】

【従来の技術】

生体にとって酸素は必須のものであるが、同時に生体成分を不必要に酸化するという危険な側面も持っている。生体は、このようないわゆる酸化ストレスに対して、一連の防御機構を備えている。ビタミン E は、生体内における重要な抗酸化物質の一つである。生体成分の中で、生体膜リン脂質、特にリン脂質中の多価不飽和脂肪酸鎖は酸素に攻撃されやすい。生体膜が酸化的障害を受けると膜透過性が上昇し、細胞は死に至る。ビタミン E は脂溶性であり、通常、細胞内では生体膜二重層に埋まって存在し、生体膜の酸化防止において最も中心的な役割を担っている。

【0003】

このビタミン E に特異的に結合するタンパクとして、 $\alpha$ -TTP はラットの肝臓の可溶性画分中から、膜間輸送を促進するタンパク質として見いだされ (Eur. J. Biochem. 177, 537, 1981)、タンパク質の精製そして遺伝子構造の解明もなさ

れた (J. Biol. Chem. 268, 17705, 1993, Biochem. J. 306, 437, 1995)。さらにヒト $\alpha$ -TTP遺伝子が、先天性ビタミンE欠乏症 (Familial isolated vitamin E deficiency; FIVE deficiency) という遺伝疾患の原因遺伝子そのものであることが明らかにされた (Nature Genetics 9, 141, 1995)。

【0004】

先天性ビタミンE欠乏症とは、ビタミンEをいくら摂取しても、体内のビタミンE濃度が上昇しない遺伝性の疾患として古くから知られていた。この患者は、神経、特に感覚神経の壊死をきたし、重篤な場合20歳前後で死亡する。ビタミンEは血漿リポタンパク質に結合して血液中を循環し、抹しょう組織に運ばれる。一方、血漿リポタンパク質は、肝臓から分泌され、最終的には再び肝臓に取り込まれて代謝されるが、食餌中から血管を経て吸収されたビタミンEは肝臓にてリポタンパク質 (VLDL) 上に組み込まれる。本遺伝病では、まさにこの過程すなわち、肝臓でのVLDLへのビタミンEの移行過程に障害がみられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、 $\alpha$ -TTPの機能解析や $\alpha$ -TTPの変異に起因する疾患のための薬剤の開発に有用な非ヒト哺乳動物を提供することを課題とする。また、従来、ビタミンE欠乏食を与えることで動物をビタミンE欠乏状態にすることは可能であったが、正常動物では、効率の良いビタミンEの再循環系 (この系に $\alpha$ -TTPが関与する) の存在のためビタミンEの体内からの完全消失には非常に長期間を要した。このビタミンEの再循環系に関与する $\alpha$ -TTP遺伝子を欠損させた動物を作製することにより、ビタミンE欠乏、言い換えれば生体内の重要な抗酸化物質欠乏に基づく疾患の解明そしてそれに対する薬剤の開発に有効な、先天的ビタミンE欠乏の酸素ストレス高感受性のモデル動物の作製を課題とする。より詳しくは、 $\alpha$ -TTP遺伝子の発現が人為的に抑制されたノックアウト動物およびその作製方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、人為的に $\alpha$ -TTP遺伝子を欠損させた哺乳動物モデルの作製を試

みた。具体的には、実施例に詳しく示されるように、マウス $\alpha$ -TTP遺伝子(cDNA、ゲノムDNA)のクローニングを行い、これを用いて相同組み換え用のベクターを構築し、これをマウス胚性幹細胞(ES細胞)に導入して組み換えクローンを得て、それをマウス個体に戻すという手法により変異した $\alpha$ -TTP遺伝子を持つマウスを得ることに成功した。本発明により得られた哺乳動物あるいはそれから樹立した細胞株は、 $\alpha$ -TTP遺伝子の欠損に基づく各種疾患の発症メカニズム、そして酸素ストレスに関連すると考えられているほかの病態(例えば、動脈硬化、糖尿病、虚血性疾患、パーキンソン病など)を解明するためのツールとして、さらにはこれらの疾患に対する治療法や治療薬の開発に対しても非常に有用なツールであると考えられ、様々な目的に応用されることが期待される。

【0007】

本発明は、以下の(1)～(4)に関するものである。

- (1)  $\alpha$ -TTPをコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されている非ヒト哺乳動物並びにそれから調製される非ヒト哺乳動物細胞
- (2)  $\alpha$ -TTPをコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化可能である非ヒト哺乳動物細胞
- (3) 上記(1)の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、(a)上記(2)の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および(b)該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法
- (4) 上記(1)の非ヒト哺乳動物、上記(1)及び(2)の非ヒト哺乳動物細胞を用いた医薬品のスクリーニング方法並びにそれによって得られる医薬品

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

- (1) ノックアウト動物及びそれから調製される細胞

本発明のノックアウト動物及びそれから調製される細胞は、 $\alpha$ -TTPをコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とするものである。

【0009】

遺伝子の発現を抑制する手段としては、 $\alpha$ -TTP遺伝子またはその発現制御領域の一部を欠損させる手段を例示することができるが、これに限定されるわけではない。なお、本発明において「遺伝子の発現の抑制」には、完全な抑制および部分的な抑制が含まれる。また、特定の環境下での抑制も含まれる。更に、2つのアレルの一方の発現が抑制されている場合も含まれる。

【0010】

動物の種類は、ヒトを除く哺乳動物であれば特に限定されないが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどのげっ歯類に属する動物が好ましく、その中でもマウスが特に好ましい。

本発明のノックアウト動物は、例えば、後述する方法によって作製することができる。

【0011】

本発明のノックアウト動物は、 $\alpha$ -TTP遺伝子の機能不全に起因する疾患及び酸化ストレスに基づく疾患に対する治療薬や治療方法の開発に有用である。例えば、本発明のノックアウト動物に被検化合物を投与し、動脈硬化症、糖尿病に対する影響を検査し、所望の効果を示す化合物を選択する。これにより、治療薬となり得る物質を取得することができる。

【0012】

また、本発明のノックアウト動物から調製された細胞を用いて、前述した疾患の治療薬や治療方法の開発も考えられる。例えば、本発明のノックアウト動物の胚などから細胞を調製し、被検化合物を添加し、細胞膜に対する酸化的障害などに対する影響を調べる。その結果、所望の効果を示す化合物を選択する。細胞は、初代培養細胞を用いることもできれば、株化した細胞を作製して用いることもできる。以上によりスクリーニングされた化合物は医薬品の候補となる。

【0013】

(2) 動物細胞

本発明の動物細胞は、 $\alpha$ -TTPをコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化可能であることを特徴とするものである。

遺伝子の発現を抑制する手段及びその意味、並びに対象とする動物の種類は、



上記のノックアウト動物の場合と同様である。

【 0 0 1 4 】

本発明の動物細胞を作製する方法は特に限定されないが、 $\alpha$ -TTP遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により $\alpha$ -TTP遺伝子の発現を抑制した細胞は、相同組換え（ノックアウト）用ベクターを構築し、該ベクターを適当な細胞内に導入することにより作製することができる。

【 0 0 1 5 】

該相同組換え用ベクターは、標的動物の内在性 $\alpha$ -TTP遺伝子を失活させるために設計された核酸配列を含む。このような核酸配列は、例えば、 $\alpha$ -TTP遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠失させた核酸配列でもよく、また、 $\alpha$ -TTP遺伝子またはその発現制御領域に他の遺伝子が挿入された核酸配列であってもよい。このように $\alpha$ -TTP遺伝子またはその発現制御領域に挿入される他の遺伝子としては、マーカーとしても機能する遺伝子が好ましい。このような遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子（G418耐性により選択）やチミジンキナーゼ遺伝子（ガンミクロビル耐性により選択）などの薬剤耐性遺伝子、ジフテリア毒素(DT)A遺伝子などの毒素遺伝子、またはこれらの組み合わせを用いることができる。これら遺伝子の $\alpha$ -TTP遺伝子における挿入場所は、標的における内在性 $\alpha$ -TTP遺伝子の発現を抑制しうる位置であれば特に限定されない。

【 0 0 1 6 】

クローニングした $\alpha$ -TTP遺伝子へのこれらの遺伝子の挿入は、試験管内において、通常のDNA組み換え技法を用いて行うことができる（Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)）。

このようにして構築された相同組み換え用ベクターを、個体へ分化させることが可能な細胞（例えば、ES細胞）に導入し、該細胞中の $\alpha$ -TTP遺伝子との相同組み換えを行う。

【 0 0 1 7 】

相同組み換え用ベクターの細胞への導入は、当業者によく知られた方法、例えば、エレクトロポレーション法を利用して行うことができる。この結果、一部の細胞内においては細胞中の $\alpha$ -TTP遺伝子と相同組み換え用ベクターの対応する領域

域との間で組み換えが生じ、相同組み換え用ベクター中に構築されていた遺伝子と野生型の遺伝子とが置き換わることとなる。このようにしてマーカー遺伝子が挿入された $\alpha$ -TTP遺伝子を持つ細胞を得ることができる。

【0018】

相同組換えベクターにおいてマーカー遺伝子を利用している場合には、所望の相同組換えが行なわれた細胞は、 $\alpha$ -TTP遺伝子が失活し、同時にマーカー遺伝子を得ることとなるので、このマーカー遺伝子を指標とすることにより選抜を行なうことができる。例えば、マーカー遺伝子として、薬剤耐性遺伝子を用いた場合には、ベクター導入後の細胞を、致死濃度の薬剤の存在下で培養することにより、所望の相同組換えが行なわれた細胞を選抜することができる。

本発明の動物細胞は、上述のノックアウト動物を作製するために利用することができる。また、本発明のノックアウト動物から調製される細胞と同様に医薬品のスクリーニングにも利用することができる。

【0019】

(3) 非ヒト哺乳動物の作製方法

本発明の非ヒト哺乳動物の作製方法は、(a)上述の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入し、キメラ胚を作製する工程、及び(b)該キメラ胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程を含むものである。

【0020】

(a)キメラ胚を作製する工程

胚に注入する細胞として、ES細胞を用いた場合には、これを胚盤胞に注入することによりキメラ胚を作製することができる。注入に用いる胚盤胞は妊娠した雌の子宮を灌流することによって得ることができる。

【0021】

(b)キメラ胚の移植工程

キメラ胚を偽妊娠させた哺乳動物の子宮角に移植することによりキメラ動物を得ることができる。胚に注入した細胞(ES細胞)が発生分化中の胚に取り込まれたか否かを個体作製後に検定できるようにするために、作製された個体の外的特徴(例えば、毛色)が、注入した細胞に由来する部分と胚盤胞に由来する部分

とで異なるように、胚盤胞を選択することが好ましい。

以上の二つの工程の後、キメラ動物を適当な系統の同種動物と交配させることにより産仔を得る。キメラ動物の生殖細胞が注入した細胞に由来すれば $\alpha$ -TTP遺伝子の発現が抑制された産仔を得ることができる。

#### 【0022】

##### (4) 医薬品のスクリーニング方法及びそれによって得られる医薬品

本発明の医薬品のスクリーニング方法は、上記の非ヒト哺乳動物又は上記の非ヒト哺乳動物細胞を用いることを特徴とするものである。

本発明の非ヒト哺乳動物等は、 $\alpha$ -TTP遺伝子の機能不全に起因する疾患（例えば、先天性ビタミンE欠乏症）及び酸化ストレスに基づく疾患（例えば、動脈硬化、糖尿病、虚血性疾患、パーキンソン病など）のモデルとなり得るので、これらの疾患の治療及び予防薬のスクリーニングに使用することができる。

#### 【0023】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

##### 【実施例1】 $\alpha$ -TTP遺伝子の相同組み換え用ベクターの作製

本実施例では、マウス $\alpha$ -TTP遺伝子の相同組み換え用ベクターを構築するために、まずマウス $\alpha$ -TTPゲノム遺伝子のクローニングを行った。このゲノムDNAを用い、Mansourらの報告（Nautre 336, 348, 1988）に従ってポジティブ/ネガティブセレクションを行うために、ネオマイシン耐性遺伝子およびチミジンキナーゼ遺伝子を挿入した相同組み換え用ベクターを構築した。この際、ネオマイシン耐性遺伝子は、エクソン1と置き換わるように挿入し、正常な $\alpha$ -TTPが作製できないようにした。以下具体的に説明する。

#### 【0024】

##### A. マウス $\alpha$ -TTP遺伝子のクローニング

SUPERScript Lambda System (GIBCO BRL)を用いて、マウス (C57BL/6) 肝臓のcDNAライブラリー (Lambda gt22A) を作製し、ラットTTP cDNAの全オープンリーディングフレームをプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションを行った

。その結果2つの陽性クローンが得られたが、いずれも翻訳開始点まで届いていなかった。そこでマウス肝臓より調製したtotalRNAに対してMATTP-00 (AGGAATTC ATGGCAGAGATGCG, 配列番号8) 及びMATTP-04 (AGGGCGTAGATCTGCACTTAAT, 配列番号9) をプライマーにしてRT-PCRを行った。MATTP-00の配列は同時進行していたマウスTTP genomic DNAの配列より得た。シーケンシングの結果、マウスTTP cDNAの全オープンリーディングフレーム配列を決定した。こうして得られたマウスTTP cDNAの配列を配列番号1に、またそのアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0025】

マウス $\alpha$ -TTPゲノムDNAは以下のようにしてクローニングした。

ラットTTP cDNAの全オープンリーディングフレームをプローブとしてブランクハイブリダイゼーション法によりマウス (129/SVJ) genomic DNA Lambda FIX IIライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性クローン (BS-MG6) から調製したファージDNAを制限酵素EcoRIで切断し、ラットTTPの5'側260bpをプローブにしてサザンブロッティングを行い、翻訳開始点を含むエクソンを含む断片を検出し、pBluescriptIIにサブクローニングした (TTP-MG6)。

【0026】

TTP-MG6の2749bpの塩基配列のシーケンスを行い、エクソン1がTTP-MG6に含まれていることを確認した (配列番号3)。

クローンBS-MG6を主要な制限酵素 (EcoRI, SmaI, KpnI, ApaI, EcoRV, SalI, HindIII) で切断し、その制限酵素サイトの位置の地図を作製した (図1)。

【0027】

B. 相同組み換え用ベクターの構築

クローンBS-MG6ファージDNAに含まれるマウス $\alpha$ -TTP遺伝子を、EcoRIサイトによって分割される2つの断片 (断片1, 2, 図1) に分けてそれぞれプラスミドベクターにサブクローニングを行った。すなわち、まずBS-MG6ファージDNAをEcoRIで切断し、生じた約3.75kbpの断片 (断片1) と約5.5kbpの断片 (断片2) をあらかじめsmaIサイトをSalIリンカー (Takara) を導入することによりSalIサイトに変更してあるpBluescriptII (Toyobo) のEcoRIサイトに組み込み、クローンpSKt-2とpSKot-3を得た。

## 【0028】

これらのサブクローンから以下のようにして相同組み換え用のベクターを構築した。まず、クローンpSKot-2をEcoRI/EcoRVで切断し、この切断末端をTakara DNA Blanting Kit(Takara)を用いた方法により平滑末端化した(pSKot-2-1)。次いでpSKot-2-1をSmaIで切断し、HindIIIリンカーを挿入した(pSKot-2-2)。pSKot-2-2のHindIIIサイトにpolyA添加シグナルを持たないネオマイシン耐性遺伝子を組み込みエクソン1をネオマイシン耐性遺伝子に置き換えた(pSKot-2-2Neo)。次いでpSKot-3に含まれるエクソン2のSmaIサイトにBamHI Stop Codonリンカー(日本ジーン)を導入した(pSKot-3stop codon)。pSKot-2-2NeoをEcoRIで切断し、pSKot-3stop codonからEcoRIで切断し切り出された断片を組み込んだ(pSKot-2+3Neo)。pSKot-2+3NeoをXhoIで切断し、チミジンキナーゼ遺伝子を組み込み、相同組み換え用ベクター( $\alpha$ -TTP Targeting Vector)を得た。

## 【0029】

このベクターは以下のような特徴を持つ(図2)。

- (i) 第1エクソンに置き換わる形でネオマイシン耐性遺伝子が、そして第2エクソン中に終止コドン配列が挿入されている。
- (ii) ネガティブ選択用マーカー遺伝子としてチミジンキナーゼ遺伝子を持つ。
- (iii) 野生型 $\alpha$ -TTP遺伝子との相同部分は、ネオマイシン耐性遺伝子上流が約0.8kb、ネオマイシン耐性遺伝子下流が約8kbである。

## 【0030】

【実施例2】 相同組み換えによる変異 $\alpha$ -TTP遺伝子を持つES細胞の樹立

本実施例では、相同組み換え用ベクターを、エレクトロポレーション法によりマウスES細胞 AB2.2-Prime ES Cells (LEXICON社The Mouse Kit) に導入し、次いでG418により選択培養を行った。得られたG418耐性コロニーについて、PCRおよびサザンブロットにより相同組み換え体の検定を行った。以下、具体的に説明する。

## 【0031】

相同組み換え用ベクター( $\alpha$ -TTP Targeting Vector) DNA 30 $\mu$ gをNotIで切断することにより線状化し、精製した。このDNAをマウスES細胞 AB2.2-Prime ES C

ells (LEXICON社The Mouse Kit)  $3 \times 10^7$  個を含むエレクトロポレーション用緩衝液 (LEXICON社The Mouse Kit ESQPBS) に懸濁し、Field Strength 575V/cm、Capacitance  $500 \mu\text{F}$  の条件で、遺伝子導入を行った。導入後24時間から終濃度  $300 \mu\text{g/ml}$  のG418 (Genetisin, Sigma) で選択培養を行った。

【0032】

ES細胞の培養には、ESQDMEM (LEXICON社The Mouse Kit) 培養液に終濃度15%の牛胎児血清 (ESQFBS, LEXICON社The Mouse Kit)、終濃度2mMのL-グルタミン (ESQGPS, LEXICON社The Mouse Kit)、終濃度  $100 \mu\text{M}$   $\beta$ メルカプトエタノール (ESQBME, LEXICON社The Mouse Kit)、そして終濃度50U/mlのペニシリンと終濃度  $50 \mu\text{g/ml}$  のストレプトマイシンを添加したES細胞用培地を用いた (以下ES Cell Medium)。

【0033】

また、ES細胞用のフィーダー細胞としてはESQ Feeder cells (LEXICON社The Mouse Kit) を用い、培養液はESQ DMEMに終濃度7%のFBSを添加したものをを用いた。ESQ Feeder cells ( $5 \times 10^7$  細胞/バイアル) を、37℃で急速融解後、フィーダー用培地で細胞数  $4.4 \times 10^5$  cells/mlに調整し、あらかじめゼラチンコート (LEXICON社The Mouse Kit ESQ Gelatin) した培養器に、100mm  $\phi$  ディッシュの場合は12ml、60mm  $\phi$  ディッシュの場合は4ml、6穴プレートの場合は2ml/穴、24穴プレートの場合は0.5ml/穴、そして96穴プレートの場合は  $75 \mu\text{l}$ /穴ずつ分注した。以上のように作製したフィーダー細胞は3週間以内に使用した。

【0034】

遺伝子導入後11日目から、以下のようにして、出現したG418耐性コロニーを96穴のマイクロプレートに継代した。すなわち、マイクロピペットを用いてG418耐性コロニーを  $30 \mu\text{l}$  のESQ trypsin (LEXICON社The Mouse Kit) 溶液を含む96穴のマイクロプレート (Corning 25860MP) に移し換え、数分間処理した後、  $70 \mu\text{l}$  のES細胞培養用培地を加え、ピペッティングすることによって単一細胞にした。この細胞懸濁液を96穴のマイクロプレート (Falcon 3072) に移し換え培養を継続した。3日後、96穴のマイクロプレート上の細胞がコンフルエントに達した段階で、以下のようにして細胞を2つに分割した。すなわち、細胞にTEを  $25 \mu\text{l}$  加え

分散させ、ES細胞用培地を25  $\mu$ l 加えピペティングすることによって単一細胞にした後、2×Freezing medium (LEXICON社The Mouse Kit ESQ DMEM:ESQ FBS:DM SO=2:2:1) を50  $\mu$ l 加え、その20  $\mu$ l をES細胞用培地150  $\mu$ l の入ったゼラチンコートした96穴マイクロプレート (Iwaki 4860-020) に継代し、PCRによる相同組み換え体検定用のDNAを抽出するために培養した。残りのES細胞には、流動パラフィン100  $\mu$ l (0.2  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌したもの) を加え、-80℃で凍結保存した。尚、DNA抽出用のES細胞の培養にはフィーダー細胞は用いず、その他のES細胞の培養には全てフィーダー細胞を用いて行った。相同組み換え体の検定は、PCRによって以下の通りに行った。すなわち、コンフルエントの状態まで細胞が増殖した96穴プレートの各ウェルから培地を取り除き、Lysis buffer (10x T aq buffer 5  $\mu$ l、5% NP-40 5  $\mu$ l、Proteinase K 4  $\mu$ l、H<sub>2</sub>O 36  $\mu$ l) を加え、55℃で2時間加温した。溶解したサンプルを0.5mlチューブに回収し、95℃で15分間処理した後10,000rpmで10～15分間遠心し、その上清1  $\mu$ l をPCR用の鋳型DNAとして用いた。

#### 【0035】

PCRのプライマーは、相同組み換え用ベクター上のネオマイシン耐性遺伝子のPGKプロモーターと、相同組み換え用ベクターに含まれないエキソン1上流との間、約0.9kbが増幅されるように設計した(図2)。

すなわち、PGKプロモーター上の配列を含むPGK-1プライマー (5' GCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTTG 3' : 配列番号 : 5) 及び第1エキソン上流に位置するot-198プライマー (5' AGCCCACACAAAAATGAAAAACGTCTCCAAG 3' : 配列番号 : 6) を用いて、以下の条件でPCRを行った。

#### 【0036】

##### 反応液組成

10 x ExTaqバッファー (TaKaRa) 5  $\mu$ l

2.5mM dNTPs 4  $\mu$ l

ExTaq (TaKaRa) 0.5  $\mu$ l

10  $\mu$ M ot-198プライマー 1  $\mu$ l

10  $\mu$ M PGK-1プライマー 1  $\mu$ l

サンプル 1  $\mu$  l

H<sub>2</sub>O 37.5  $\mu$  l

反応条件

95℃、1分→(94℃、30秒→62℃、1分→72℃、1分20秒) × 35サイクル→72℃、7分

PCRの結果から相同組み換え体であると考えられたクローンは、調べたG418耐性クローン316個中5個(クローンL44、クローンL228、クローンL236、クローンL253、クローンL 254)であった。

#### 【0037】

PCR解析で相同組み換えが確認されたクローンは、凍結保存してあった96穴プレートに37℃に温めることにより融解し、24穴プレートに継代した。この24穴プレートを24時間、37℃で培養後、DMSOと流動パラフィンを除くために培地を交換した。それぞれのクローンが75～90%コンフルエントに達した時点で24穴から6穴プレートに継代した。さらに、6穴プレートに75～90%コンフルエントまで増殖したものが2穴分得られたところで、1穴分は凍結保存し、残りの1穴分は胚盤胞への注入及びDNA抽出に使用した。

#### 【0038】

凍結保存は以下の如く行った。すなわち、細胞をESQ PBSで2回リンスした後、0.5mlのESQ Trypsin (LEXICON社The Mouse Kit) を加え、37℃で15～20分間保温しトリプシン処理を行った後、さらに0.5mlのES Cell mediumを加え、35～40回ピペッティングを行いES細胞の塊を完全に解離させた。この細胞懸濁液を15ml遠心チューブに移し、さらに1mlのES Cell Mediumでウェルを洗ってチューブに回収した。チューブを1,000rpmで7分間遠心し、培地を取り除き 0.25ml ES Cell Medium に再懸濁し、0.25mlの2 x Freezing medium を加えた。クライオジェニックバイアルにウェルの中身に移し、-80℃で凍らせ、液体窒素中で保存した。

#### 【0039】

胚盤胞への注入及びDNA抽出用の細胞は、ES細胞の塊を完全に解離させた後、その四分の一を胚盤胞への注入に用い、残りの細胞の三分の一、及び三分の二をそれぞれゼラチンコートした60mmディッシュに継代した。前者は細胞がコンフル



エントにまで増殖したところでサザンブロット解析用のゲノムDNAを抽出し、後者の細胞はコンフルエントにまで増殖したところで3本に分けて凍結した。

【0040】

〔実施例3〕 組み換え $\alpha$ -TTP遺伝子を持つES細胞によるキメラマウスの作製  
 相同組み換えが確認されたES細胞クローンについて、C57BL/6J系マウスの胚盤胞を宿主胚としてキメラ胚を作製し、それを偽妊娠マウスの子宮角に移植して産仔を得た。宿主胚の採取は、妊娠2日目に、100 $\mu$ M EDTAを添加した Whitten's培地で、卵管と子宮を灌流することによって行った。8細胞期胚または桑実胚を24時間Whitten's培地で培養し、得られた胚盤胞を注入に用いた。注入に用いたES細胞は、継代してから2あるいは3日目にTE処理により分散させ、顕微操作に供するまで4℃で静置した。

【0041】

ES細胞の注入用ピペットとしては、Cook IVF社製のpolar body extrusion pipette (内径約20 $\mu$ m) を用いた。胚保定用ピペットとしては、外径1mmの微小ガラス管 (NARISHIGE) を微小電極作製器 (Sutter社P-98/IVF) を用いて細く引き延ばした後、マイクロフォージ (De Fonburun) を用いて外径50~100 $\mu$ mの部分で切断し、さらに口径を10~20 $\mu$ mに加工したものをを用いた。

【0042】

注入用ピペットと保定用ピペットは、先端から約5mmの部分を実約30度曲げて、マイクロマニピュレーター (LEITZ) に接続した。顕微操作に用いたチャンバーとしては、穴あきスライドガラスにカバーガラスを蜜蝋で接着したものをを用い、その上に約20 $\mu$ lの0.3% BSAを加えたHepes-buffered Whitten's培地のドロップを2個置き、上面を流動パラフィン (ナカライテスク261-37 SP) で覆った。一方のドロップには、約100個のES細胞を入れ、他方には拡張胚盤胞を10~15個入れ、胚1個あたり10~15個のES細胞を注入した。

顕微操作はすべて、倒立顕微鏡下で行った。操作胚は、1~2時間の培養後、偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し、里親に保育させた。

【0043】

C57BL/6J系マウスの胚盤胞40個に、クローンL236 ES細胞を注入した結果、40個の胚盤胞への注入が成功した（成功率100%）。この40個を偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した結果、5匹の産仔が得られた。相同組み換え体に由来する部分の毛色は野生色を呈し、C57BL/6J系マウスに由来する部分の毛色はブラック色を呈する。得られた5匹の産仔のうち、全例が毛色からキメラマウスと判定でき、形態的に雄を示していた。これらのキメラマウスにおける毛色から判断したES細胞の寄与率は10～90%の幅であった。同様に、クローンL253 ES細胞からもキメラマウスが得られた。これらのキメラマウス作出に関する成績を表1に示した。

【0044】

【表1】

キメラマウス作出成績表

クローンNo.	注入胚数 / 操作胚数 (%)				移植胚数 / 着床数 (%)				産仔数				毛色キメラ数				ES細胞の毛色への寄与率
									Total	(%)	♂	♀	Total	(%)	♂	♀	
L228	22	/	25	88%	22	21	95%	10	45%	6	4	4	40%	2	2		♂(70,70) ♀(80,5)
L236	40	/	40	100%	40	24	60%	14	35%	11	3	5	36%	5	0		♂(90,90,90,70,10)
L253	75	/	77	97%	75	65	87%	11	15%	7	4	8	73%	5	3		♂(95,80,70,50,30) ♀(60,50,10)
L44	64	/	72	89%	64	42	66%	16	25%	16	0	11	69%	11	0		♂(90,90,90,80,80,70,50,40,30,20,5%)

【0045】

【実施例4】 相同組み換え体の生殖系列への伝達の検定

実施例3のキメラマウスをC57BL/6J系マウスと交配させ、ES細胞由来の産仔が得られるか否かを検定した。キメラマウスの生殖細胞がES細胞に由来していれば、娩出される産仔の毛色は、野性色を呈し、C57BL/6J系マウスの胚盤胞に由来していればブラック色を呈することとなる。

【0046】

クローンL236 ES細胞については、性成熟に達する前に死亡した1例を除いた2例（No.L236-1～2）の雄キメラマウス全例において、ES細胞の生殖系列への伝達を確認された。野性色を示した産仔数／得られた産仔数は、それぞれ、32/44と19/44であった。またクローンL254 ES細胞についても、6例（No. L254-1～6）のキメラマウスのうち4例（No. L254-1、2、4、5）においてES細胞の生殖系列への伝達を確認された。野性色を示した産仔数／得られた産仔数は、それぞれ、4/15、2/12、2/14と4/9であった。

【0047】

次に、これらの野性色マウスの尾の一部からDNAを抽出し、PCRにより、変異 $\alpha$ -TTPアリルが伝達されているかを調べた。その結果、クローンL236 ES細胞由来の産仔、そしてクローンL254 ES細胞由来の産仔においても変異 $\alpha$ -TTPアリルが伝達されていることが確認された。

【0048】

片側のアリルの $\alpha$ -TTP遺伝子に変異を持つヘテロ欠損マウス同士の交配により、両側のアリルに変異を持つホモ欠損マウスの作製を行った。野生型、ヘテロ欠損そしてホモ欠損マウスの各遺伝子型の解析には、PCRによって行った。すなわち、変異アリルの存在を前述のot-198とPGK-1のプライマーの組み合わせでPCRを行い、野生型アリルの存在をot-198プライマーとエクソン1の配列を含むTTP N17プライマー（5' TCTCTGCAATGCCCGCCGTGCTGTCCCG 3'）（配列番号7）との組み合わせでPCRを行った。尚、ot-198とTTP N17プライマーとの組み合わせで行うPCRの反応は、前述のot-198とPGK-1のプライマーの組み合わせでPCRを行う条件と同様である。この2つのプライマーの組み合わせを用いPCRを行い、野生型アリルの存在が検出でき、変異アリルの存在が検出できないものを野生型マウス、その反対に野生型アリルの存在が検出できず、変異アリルの存在が検出できたものをホモ欠損マウス、そして野生型と変異アリル両方が検出された場合をヘテロ欠損マウスと判定した（図3）。

【0049】

また、ホモ欠損マウスの一部については、ネオマイシン耐性遺伝子と置換させることにより欠損させたエクソン1周辺のSmaI-SmaI-SmaIサイトの間の配列をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、エクソン1の欠損を確認した（図4）。

【0050】

その結果得られた産仔の各遺伝子型は、野生型：ヘテロ欠損：ホモ欠損マウスの比率は、63匹：105匹：74匹（計242例）であり、ほぼメンデルの法則通り1：2：1の割合になっていた。メンデルの法則どおりの理論値では、242例では60.5匹：121匹：60.5匹になる。

## 【 0 0 5 1 】

[実施例 5]  $\alpha$ -TTP 欠損マウスの  $\alpha$ -TTP の発現解析

$\alpha$ -TTP ホモ欠損マウス 6 例、ヘテロ欠損マウス 5 例そして野生型マウス 4 例の各個体の肝臓より、total RNA とタンパク質を採取し、それぞれノーザンブロット法とウエスタンブロット法で  $\alpha$ -TTP の mRNA とタンパク質の発現を確認した。その際、ノーザンブロット法における mRNA の発現の確認には、マウス  $\alpha$ -TTP の cDNA ORF 全長をプローブとして用い、イメージアナライザーの PSL 値から発現量を求めた。ウエスタンブロット法には抗 rat  $\alpha$ -TTP ポリクローナル抗体を用い、二次抗体として alkaline phosphate-conjugated anti rabbit IgG を用い、AP conjugate substrate kit (Bio-Rad) で発色した。その結果、ホモ欠損マウスでは、mRNA としてタンパク質においても全く  $\alpha$ -TTP の発現が検出されなかった。またヘテロ欠損マウスでは、mRNA としてタンパク質においても  $\alpha$ -TTP の発現が、野生型のそれと比較し約 1/2 程度であった (図 5、6)。

## 【 0 0 5 2 】

$\alpha$ -TTP ホモ欠損マウス、ヘテロ欠損マウスそして野生型マウスの血中  $\alpha$ -トコフェロール濃度の測定を行った。測定法は、Kim, H. S. et al. らの方法に従って行った (Free Rad. Res. 28, 87-92, 1998)。すなわち、ヘパリン採血したマウス血漿 50  $\mu$ l に 950  $\mu$ l の PBS を加え、1ml の 6% pyrogallol in EtOH を加え、混合し、70℃で 2 分間放置した後に 60% KOH を 0.2ml 加え、70℃で 30 分間けん化し、5ml n-hexane, 2.5ml H<sub>2</sub>O を加え、ボルテックスした後に遠心、n-hexane 層を 4ml 回収した。そして、エバポレーション後、100  $\mu$ l エタノールに溶かし、HPLC で解析した。HPLC の条件は、カラム: IRIKA RP18 (250X4mm)、移動相: MeOH/H<sub>2</sub>O/NaClO<sub>4</sub> (1000/2/7, v/v/w、検出: IRIKA Amperometric E-520 detector で行った。なお、内部標準物質として tocol を用いた。

## 【 0 0 5 3 】

その結果、ホモ欠損マウスの血中  $\alpha$ -トコフェロール濃度は、検出限界以下であった。またヘテロ欠損マウスの血中  $\alpha$ -トコフェロール濃度は、野生型のそれと比較し約 1/2 の濃度であった (図 7)。このことから  $\alpha$ -TTP の発現量が血中  $\alpha$ -トコフェロール濃度を規定する因子であることが示された。

## 【0054】

## 【実施例6】 胎児吸収一妊娠試験 (Resorption-Gestation Test)

ビタミンEが、抗不妊作用物質として発見された経緯から、ビタミンE欠乏症に対する生物学的試験法として、胎児吸収一妊娠試験法が広く利用されている (Biol. Syposia 12, 459, 1947)。すなわち、ビタミンE欠乏食を与えた動物を妊娠させた場合に、胎仔の発生が止まり、その後胎仔が吸収されてしまう現象を利用した試験法である。この試験法を、 $\alpha$ -TTPホモ欠損マウスにおいて行い、ビタミンE欠乏症の状態を生物学的に確認した。その結果、 $\alpha$ -TTPホモ欠損マウスは、妊娠するものの、胎仔の発生は妊娠中期に止まり、吸収されていることが確認された (表2)。

## 【0055】

【表2】

$\alpha$ -TTPノックアウトマウスの胎児吸収一妊娠試験									
雌マウスの遺伝子型	個体番号	×	雄マウスの遺伝子型	個体番号	着床胚数	退行・吸収胎仔数	(%)*	生存胎仔数	(%)*
ホモ	42	×	ホモ	15	16	16	100	0	0
	44	×		17	16	16	100	0	0
	46	×		31	7	7	100	0	0
	27	×		4	0	—	—	—	—
	6	×		3	0	—	—	—	—
	計				39	39	100	0	0
	5	×	野生型	C57BL/6J	8	8	100	0	0
	8	×		C57BL/6J	11	11	100	0	0
	17	×		C57BL/6J	10	10	100	0	0
	13	×		C57BL/6J	6	6	100	0	0
	計				35	35	100	0	0
野生型	C57BL/6J	×	ホモ	10	4	1	25	3	75
	C57BL/6J	×		2	9	2	22	7	78
	C57BL/6J	×		12	9	0	0	9	100
	C57BL/6J	×		15	9	9	100	0	0
	ICR	×		15	15	0	0	15	100
	ICR	×		15	16	2	13	14	87
	C57BL/6J	×		31	10	10	100	0	0
	ICR	×		31	16	1	6	15	94
	計				88	25	28	63	72

\*着床数に対する%を示す

## 【0056】

また野生型の2細胞期卵を偽妊娠状態のホモ欠損マウスの卵管に移植した場合においても、胎仔の発生が止まり、吸収されていることが確認された (表3)。

## 【0057】

【表 3】

野生型の卵を $\alpha$ -TTPノックアウトホモ雌に移植した場合の胎仔吸収—妊娠試験成績									
ホモ雌の 個体番号	移植した卵子 の遺伝子型	移植時の 卵子の発 生段階	移植卵子 数	着床数	(%) *	退行・吸 収胚数	(%) **	生存胎仔 数(移植後 18日目)	(%) **
11	野生型(ICR)	前核期	12	0	0	—	—	—	—
14	野生型(ICR)	前核期	12	1	8%	1	100%	0	0%
7	野生型(ICR)	2細胞期	12	11	92%	11	100%	0	0%
15	野生型(ICR)	2細胞期	12	10	83%	10	100%	0	0%
計			48	22	46%	22	100%	0	0%

\*: 移植卵子数に対する%

\*\*: 着床数に対する%

【0058】

このことから妊娠雌のビタミンE量が、胎仔の遺伝型に関係なく胎仔の発生に  
関与していることが証明された。この結果から、 $\alpha$ -TTPホモ欠損マウスにおける  
ビタミンE欠乏状態が生物学的試験法において示された。

【0059】

【発明の効果】

本発明により、 $\alpha$ -TTP遺伝子の発現が人為的に抑制された哺乳動物が提供され  
る。本発明の哺乳動物は、先天性ビタミンE欠乏症などの $\alpha$ -TTP遺伝子の欠損に  
基づく疾病の発症、さらに酸素ストレスに関連すると考えられている病態機構の  
解明、及び治療薬、治療法等の開発のためのツールとして非常に有用である。

【0060】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Keizo Inoue

Hiroyuki Arai

<120> An animal with a knocked out  $\alpha$ -tocopherol transfer protein gene

&lt;130&gt; P99-0428

&lt;160&gt; 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 837

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(834)

<400> 1

atg gca gag atg cgg ccg ggg cca ttg gtt ggg aaa cag ctc aac gag 48

Met Ala Glu Met Arg Pro Gly Pro Leu Val Gly Lys Gln Leu Asn Glu

1 5 10 15

ctg ccc gac cac tcg ccg ctg ctc cag ccc ggc ctg gcg gag ctc agg 96

Leu Pro Asp His Ser Pro Leu Leu Gln Pro Gly Leu Ala Glu Leu Arg

20 25 30

cgc cgg gtg cag gag gca ggc gtc ccg cag acc ccg cag cct ctc aca 144

Arg Arg Val Gln Glu Ala Gly Val Pro Gln Thr Pro Gln Pro Leu Thr

35 40 45

gac gct ttc ctg ctg cgc ttc ctg cgc gcc cgg gat ttc gat ctg gat 192

Asp Ala Phe L u Leu Arg Phe Leu Arg Ala Arg Asp Phe Asp Leu Asp

50 55 60

ctg gcc tgg cgc tta atg aaa aac tat tat aaa tgg cga gca gaa tgc 240  
 Leu Ala Trp Arg Leu Met Lys Asn Tyr Tyr Lys Trp Arg Ala Glu Cys  
 65 70 75 80

cca gaa tta agt gca gat cta cgc cct aga agt atc ctt gga ctt ctg 288  
 Pro Glu Leu Ser Ala Asp Leu Arg Pro Arg Ser Ile Leu Gly Leu Leu  
 85 90 95

aaa gct ggc tac cat ggc gtg ctc agg tcc cgg gat tct act ggc agt 336  
 Lys Ala Gly Tyr His Gly Val Leu Arg Ser Arg Asp Ser Thr Gly Ser  
 100 105 110

aga gtt ctc att tac aga att gca tac tgg gac cca aaa gtt ttt aca 384  
 Arg Val Leu Ile Tyr Arg Ile Ala Tyr Trp Asp Pro Lys Val Phe Thr  
 115 120 125

gct tat gat gta ttt cgt gta agt ctg atc aca tca gag ctc att gta 432  
 Ala Tyr Asp Val Phe Arg Val Ser Leu Ile Thr Ser Glu Leu Ile Val  
 130 135 140

cag gag gtg gaa act caa cgc aat gga gtt aaa gct ata ttt gac ctg 480  
 Gln Glu Val Glu Thr Gln Arg Asn Gly Val Lys Ala Ile Phe Asp Leu  
 145 150 155 160

gaa ggc tgg cag gtt tct cat gct ttc caa att acc cca tct gta gcc 528  
 Glu Gly Trp Gln Val Ser His Ala Phe Gln Ile Thr Pro Ser Val Ala  
 165 170 175

aag aag att gct gct gta ctt aca gat tcc ttt cca ctg aaa gtt cgt 576



Lys Lys Ile Ala Ala Val Leu Thr Asp Ser Phe Pro Leu Lys Val Arg  
 180 185 190

ggg atc cat ttg ata aat gag cca gtc att ttc cat gct gtc ttc tcc 624  
 Gly Ile His Leu Ile Asn Glu Pro Val Ile Phe His Ala Val Phe Ser  
 195 200 205

atg att aaa cca ttt ctg act gaa aag att aag gac cgg att cat ctg 672  
 Met Ile Lys Pro Phe Leu Thr Glu Lys Ile Lys Asp Arg Ile His Leu  
 210 215 220

cac ggg aac aac tac aaa tca agc atg ctt cag cac ttc cca gac att 720  
 His Gly Asn Asn Tyr Lys Ser Ser Met Leu Gln His Phe Pro Asp Ile  
 225 230 235 240

ctt cct cgg gaa tat ggc ggt aaa gag ttc tcc atg gag gat att tgt 768  
 Leu Pro Arg Glu Tyr Gly Gly Lys Glu Phe Ser Met Glu Asp Ile Cys  
 245 250 255

cag gag tgg aca aat ttt ata atg aag tct gaa gat tat ctc agc agc 816  
 Gln Glu Trp Thr Asn Phe Ile Met Lys Ser Glu Asp Tyr Leu Ser Ser  
 260 265 270

att tct gag acc atc caa tga 837  
 Ile Ser Glu Thr Ile Gln  
 275

<210> 2

<211> 278

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Glu Met Arg Pro Gly Pro Leu Val Gly Lys Gln Leu Asn Glu

1 5 10 15

L u Pro Asp His Ser Pro Leu Leu Gln Pro Gly Leu Ala Glu Leu Arg

20 25 30

Arg Arg Val Gln Glu Ala Gly Val Pro Gln Thr Pro Gln Pro Leu Thr

35 40 45

Asp Ala Phe Leu Leu Arg Phe Leu Arg Ala Arg Asp Phe Asp Leu Asp

50 55 60

Leu Ala Trp Arg Leu Met Lys Asn Tyr Tyr Lys Trp Arg Ala Glu Cys

65 70 75 80

Pro Glu Leu Ser Ala Asp Leu Arg Pro Arg Ser Ile Leu Gly Leu Leu

85 90 95

Lys Ala Gly Tyr His Gly Val Leu Arg Ser Arg Asp Ser Thr Gly Ser

100 105 110

Arg Val Leu Ile Tyr Arg Ile Ala Tyr Trp Asp Pro Lys Val Phe Thr

115 120 125

Ala Tyr Asp Val Phe Arg Val Ser Leu Ile Thr S r Glu Leu Ile Val

130

135

140

Gln Glu Val Glu Thr Gln Arg Asn Gly Val Lys Ala Ile Phe Asp Leu

145

150

155

160

Glu Gly Trp Gln Val Ser His Ala Phe Gln Ile Thr Pro Ser Val Ala

165

170

175

Lys Lys Ile Ala Ala Val Leu Thr Asp Ser Phe Pro Leu Lys Val Arg

180

185

190

Gly Ile His Leu Ile Asn Glu Pro Val Ile Phe His Ala Val Phe Ser

195

200

205

Met Ile Lys Pro Phe Leu Thr Glu Lys Ile Lys Asp Arg Ile His Leu

210

215

220

His Gly Asn Asn Tyr Lys Ser Ser Met Leu Gln His Phe Pro Asp Ile

225

230

235

240

Leu Pro Arg Glu Tyr Gly Gly Lys Glu Phe Ser Met Glu Asp Ile Cys

245

250

255

Gln Glu Trp Thr Asn Phe Ile Met Lys Ser Glu Asp Tyr Leu Ser Ser

260

265

270

Ile Ser Glu Thr Ile Gln

275

<210> 3

<211> 2748

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (1139)..(1342)

<400> 3

gaattcaaag ctctcagccc ggtaaccaag caccacagcc agctctcttt gtgattcagg 60

ggttcacacc acaacacagc cgcttggcct tgttccctgg tgtttgctta atgttctcct 120

acaccatgga ggagatttac ctctgctcct ttactttcca gccacacaa aaatgaaaaa 180

cgtctccaag gcaagagttc tgttttgagg atatcctcaa taatcggaac atggtctcta 240

ccaagagcc actccatcag acattcttgc tctgagttcc ttttaaggcct ctttcactcg 300

caaatcagt gttttgtgaa catgcactgc atattaagag gagttagttt tgtggacttt 360

cttctgttca ggtggcagtt caagtgtagg ataattttaa tggaatgaa ggaaaaatac 420

ttccgtgtgt tcattcagat ttccggtca tctctgtgta ttcttcagca gacatccttc 480

aggttcctta agtaagggtt ttgattgaga gactgggtggc atctaaacac atacatcgtt 540

agtgtttaaa aatgtgacct cccccacccg ctctcctttc tctagtagag ccagatgcca 600

agatctggaa gcattttcct ggagagaagc aaggaggagg aggaggagac tgccaaaagg 660

tgacttcctt gagttacatt ttggaaacta gttagaatgc cagagatggc ctgagctcag 720

ccttaaggaa ggggtcagga ggagggttcc tgagtgtctg ctaccaagc taattaaaga 780

gccgtttaca gtgttccttg attccaaaac ggacagaggg ggaagggcaa cgaggaaagg 840

gtgagaaaag tctctggcag cctgattata aacatcccaa gtaacttttc gatttcccg 900

tctttaggtt caacactagt gattttcct tcccctggga ctggctgcgg ttaccctggt 960

gagcaccgga gggcaccacg tgggttctt taagaggcg ccgtgaccct tgcaccggcg 1020

gggcacggga gatcggggcg gcccggtga gtgtgcgtgg ggcggcgtcc acggcggggg 1080

gcggagggtg gctctgggcc cgcacttttc cccctgtcgc cgggacagca cggcgggc 1138

atg gca gag atg cgg ccg ggg cca ttg gtt ggg aaa cag ctc aac gag 1186

Met Ala Glu Met Arg Pro Gly Pro Leu Val Gly Lys Gln Leu Asn Glu

1

5

10

15

ctg ccc gac cac tcg ccg ctg ctc cag ccc ggc ctg gct gag ctc agg 1234

Leu Pro Asp His Ser Pro Leu Leu Gln Pro Gly Leu Ala Glu Leu Arg

20

25

30

cgc cgg gtg cag gag gca ggc gtc ccg cag acc ccg cag cct ctc aca 1282

Arg Arg Val Gln Glu Ala Gly Val Pro Gln Thr Pr Gln Pr Leu Thr

35

40

45

gac gct ttc ctg ctg cgc ttc ctg cgc gcc cgg gat ttc gat ctg gat 1330

Asp Ala Phe Leu Leu Arg Phe Leu Arg Ala Arg Asp Phe Asp Leu Asp

50

55

60

ctg gcc tgg cgc gtaagtgtgc accgggggcg ggcagagctc ggcgacggcg 1382

Leu Ala Trp Arg

65

gaatccacgc gcgccgagcg tggcagtgtg actgcaggcg cgcccagaac cccgatttcg 1442

ccccgccga tgttttggtc cccgccgccg cgaggacatc ccgtggacta ctagggctct 1502

tgggaattaa acaaagtgga gatccctgtc ccccggggtg ctcagctgtg ttaactgaat 1562

agataactag gtgtggacag aggacgacga aatggacatc taaaggcatc ttgaaaaaga 1622

ctatgttaat agagctaaat gcacagtttg gcatgtttga maccagggc agtacagatg 1682

atttcittta tgtttcaggt attcacaaca cactggcctt ggggcaagag agatggggcc 1742

ttagggtcag ggagatgcga ccttgacttt gtccctcttg gggtcagcac cttatctgt 1802

tcagtaactg tgaggacatg acagtagttt cgagaattgc acattaacct ggaatgctag 1862

aacaagatgt gccaaacct gtgcttggca cggagaaagt agtcagtgat cagcaggctg 1922

cggatticca acatgccctg ggtttatgaa acttttttta ttggataagc accaagtatg 1982

gcaaaaaaca ccacaaacaa tacaaaacag gaaaaacdtc aaaggaattt cctaaaagaa 2042

aagaatttcc caacacaaac tctagttaga ccttgaggac ccagaagtat ggcattacct 2102

gttacgtcaa gcctgtgtaa caatgtcacg caaacatgcg ctgtgagttt atttttcctt 2162

tgcaaatctc aactgcatgc tgttatagaa tcaggatcatg tgaacatgtg ctcacaccta 2222

ctactctttt gggaatatct agtcagtttt ttgtttgtgg ctgtagagat tgttaccggg 2282

cgggtgctgt taggccctat gctgatcgtt catccctaca ttcagtgatg ggggacccag 2342

cgctgccatg ttcactgttc atctcttcat ttcatttgga gtttctcctt ctttttcttt 2402

ctttttcttt tcttttcttt ttaatatcca cacactgcct agcagtatac aaatgccatc 2462

aacaggtgag tattttcttc tctccctgac tgcattctaag ttggtctttg tctgtacaca 2522

taaattggaa catatcctta ttgaacaaat ccatcagttg ctgaagcacg acgcagacat 2582

gtttactgtt gaggagcgca ccacctttgc agggagtttt cagtgtttgc tactctgatg 2642

aaatgcacac tgcatagtga cgtctttttc tctctattgt tatgtacact gtcttaccaa 2702

atrggatgta tgcctgctag atgaggatag ttttgcattt cattat 2748

<210> 4

<211> 68

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Glu Met Arg Pro Gly Pro Leu Val Gly Lys Gln Leu Asn Glu

1 5 10 15

Leu Pro Asp His Ser Pro Leu Leu Gln Pro Gly Leu Ala Glu Leu Arg

20 25 30

Arg Arg Val Gln Glu Ala Gly Val Pro Gln Thr Pro Gln Pro Leu Thr

35 40 45

Asp Ala Phe Leu Leu Arg Phe Leu Arg Ala Arg Asp Phe Asp Leu Asp

50 55 60

Leu Ala Trp Arg

65

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

-ctaaagcgc atgctccaga ctgccttg

<210> 6

<211> 31



<212> DNA

<213> Artificial Sequenc

<400> 6

agcccacaca aaaatgaaaa acgtctccaa g

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

tctctgcaat gcccgccgtg ctgtcccg

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

aggaattcat ggcagagatg cg

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

agggcgtaga tctgcactta at

【図面の簡単な説明】

【図1】

BS-MG6の制限酵素サイトを示す図である。

【図2】

相同組換え用ベクターの構造を示す図である

【図3】

野生型 $\alpha$ -TTP遺伝子及び変異型 $\alpha$ -TTPのそれぞれに特異的なプライマーを用いたPCRの結果を示す図である。

【図4】

マウスゲノムDNA断片の電気泳動の結果を示す図（図4-1）、エクソン1周辺の配列を有するプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションの結果を示す図（図4-2）である。

【図5】

マウス $\alpha$ -TTPcDNAをプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す図（図5-1）、ノーザンハイブリダイゼーションのシグナル強度を示す図（図5-2）である。

【図6】

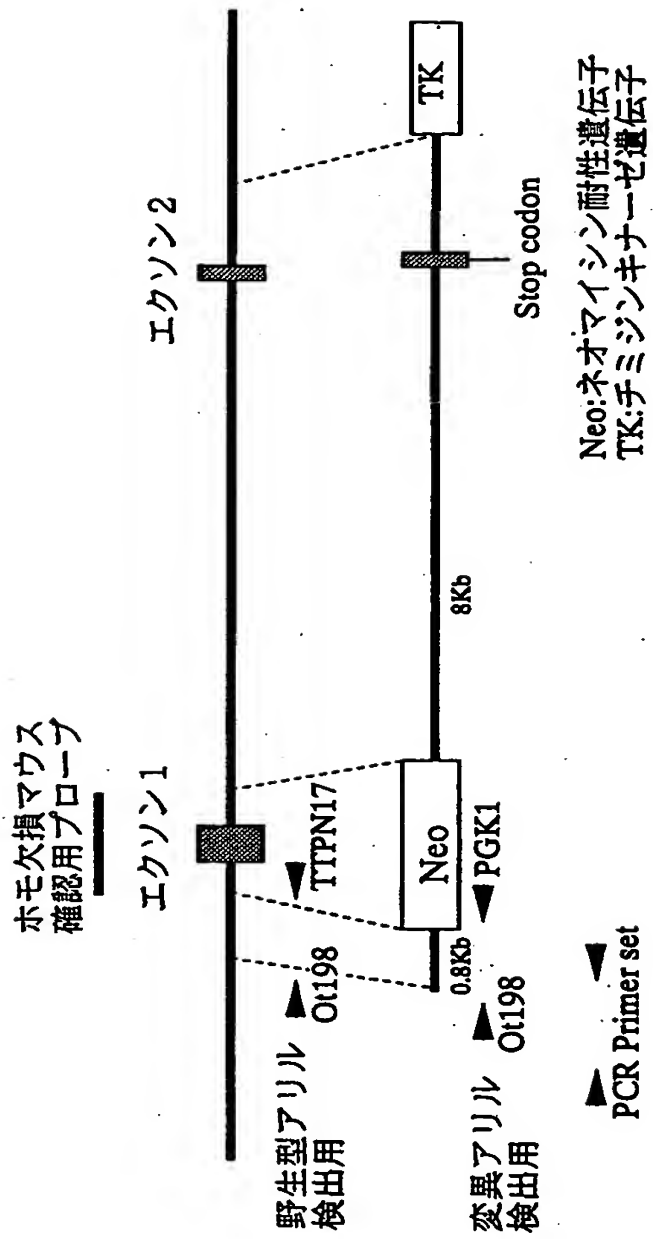
抗rat $\alpha$ -TTPポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図7】

マウス血中トコフェロール値の経時的変化を示す図である。

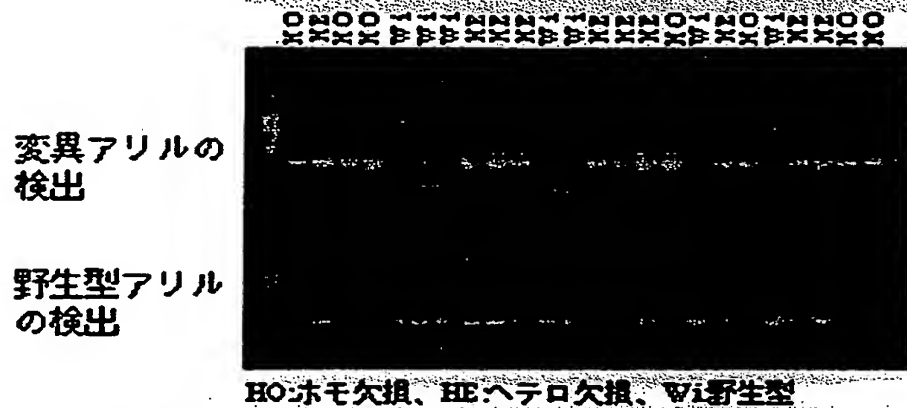


【図 2】



# $\alpha$ -TTP Targeting Vector

【図 3】



PCRによる $\alpha$ -TIPノックアウトマウスの  
遺伝子型判定  
泳動の上下が同一個体

【図 4】

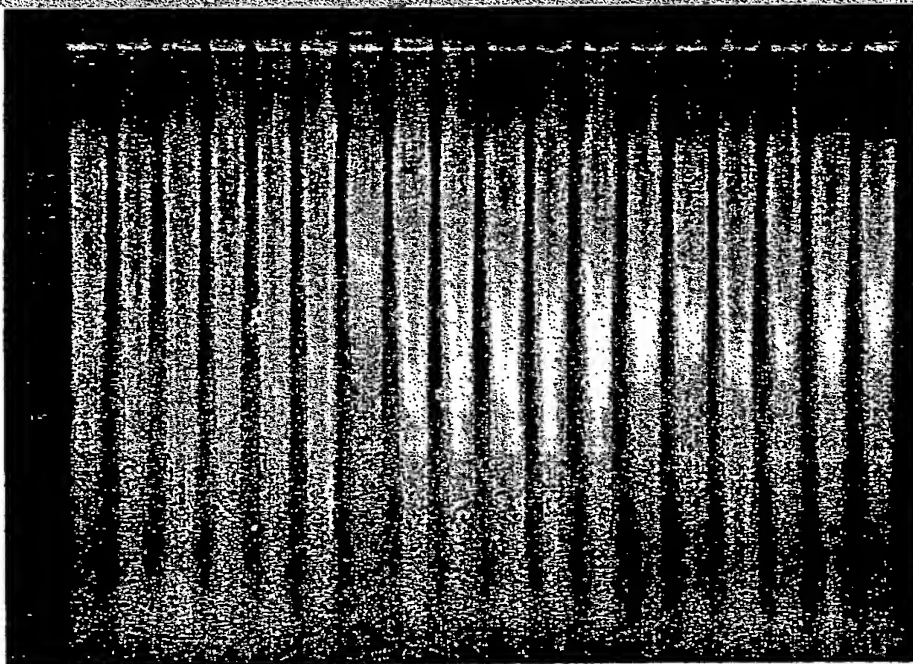


図4-1 サザンハイブリダイゼーションによる $\alpha$ -TIPノックアウト  
ホモマウスのエクソン1の欠損の確認  
マウスのゲノムDNAを制限酵素EcoRIで切断した後、0.7%アガロースゲルで  
電気泳動を行った。各レーン15 $\mu$ gのゲノムDNAが泳動されている。

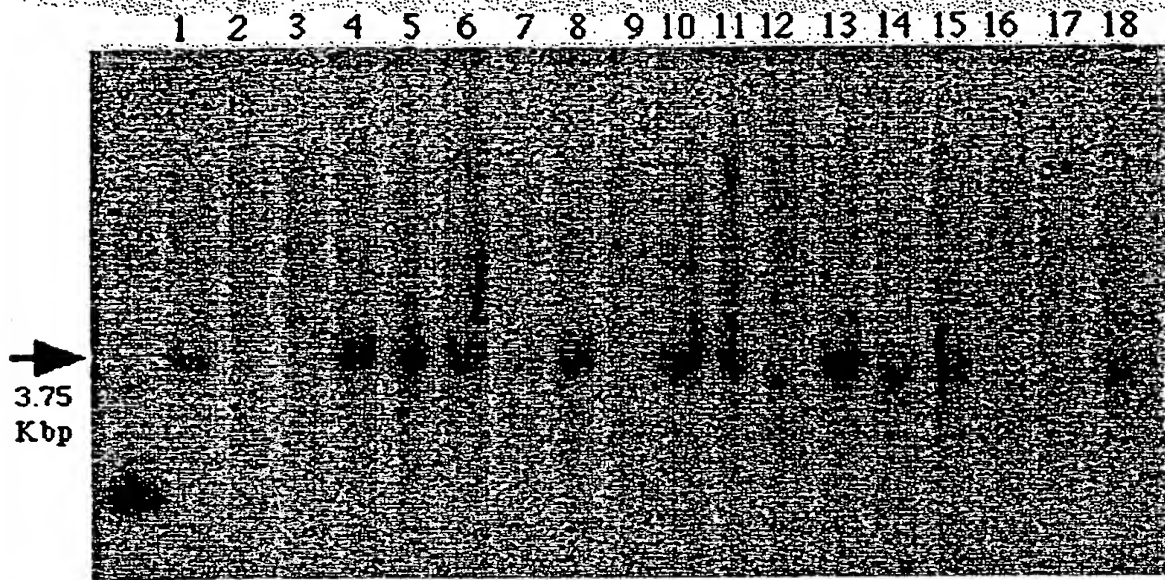
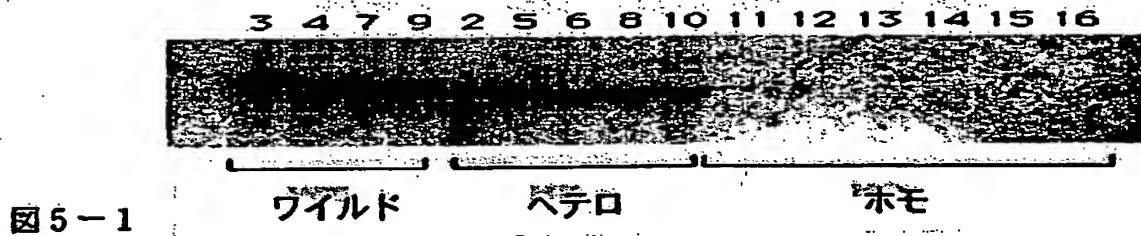


図4-2 サザンハイブリダイゼーションによる $\alpha$ -TTPノックアウト  
ホモマウスのエクソン1の欠損の確認  
図4-1をHybond N+ナイロンフィルター(Amersham)に転写  
し、エクソン1周辺のSmaI-SmaI-SmaIサイト間の配列を  
プローブにしてサザンハイブリダイゼーションを行った。  
矢印のところにシグナルが検出されないマウス(No2、3、  
9、12、16、17)は、エクソン1周辺の配列が欠損しているこ  
を示している。

【図5】



α-TTP ノーザンブロッティング

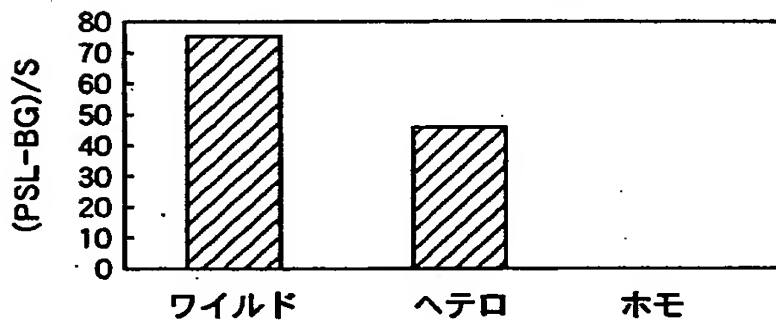


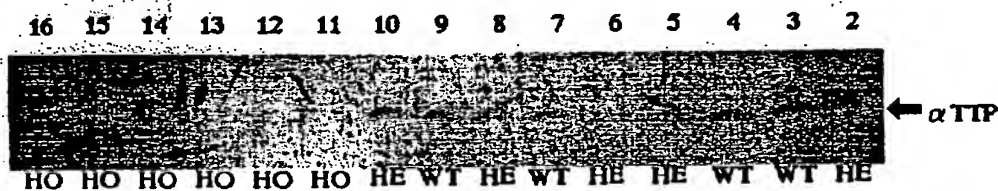
図5-2

ノーザンブロット法による α-TTPノックアウトマウスの α-TTP遺伝子発現解析

10ugのtotal RNAに対し、マウス α-TTP cDNAをプローブにしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った(図5-1)。シグナルの強度をBAS5000(Fuji Film)で検出した(図5-2)。α-TTP遺伝子のmRNA発現量がホモ：ヘテロ：ワイルドで0：1：2であることが示された。

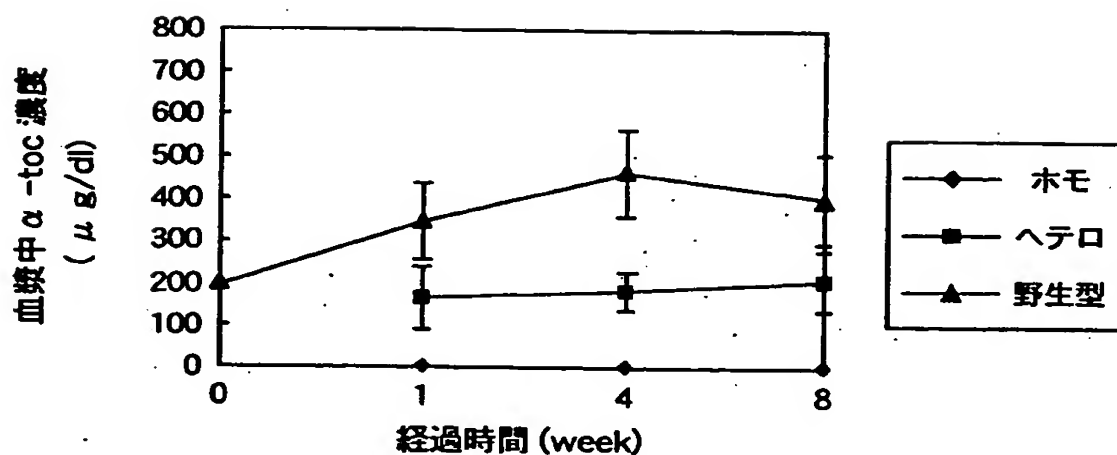
【図6】

・ Western blotting(anti-rat αTTPポリクローナル抗体での検出)



→タンパクの発現がWT:HE:HOで約2:1:0になっている。

【図 7】



$\alpha$ -TTPノックアウトマウスの血中 $\alpha$ トコフェロール値  
ホモ、ヘテロ欠損マウスそして野生型マウスに、4週令の時点より  
82  $\mu$ mol/kgの濃度の $\alpha$ トコフェロールを給餌し、それぞれの  
血中 $\alpha$ トコフェロール値を測定した。ホモ、ヘテロ欠損マウスそして  
野生型マウスの血中 $\alpha$ トコフェロール値の比率が、ほぼ0:1:2  
になっていることが示された。



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】  $\alpha$  - TTP遺伝子の発現が人為的に抑制されたノックアウト動物及びその作製方法を提供することを課題とする。

【解決手段】  $\alpha$  - TTP遺伝子を時期特異的、組織特異的に破壊しうる哺乳動物が提供された。本発明の哺乳動物は、先天性ビタミンE欠乏症や、その他動脈硬化や糖尿病などの酸化ストレスに基づく疾病の発症機構の解明、及び治療薬、治療法等の開発のためのツールとして非常に有用である。

【選択図】 なし

特平11-237003

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000118947]

1. 変更年月日 1990年 8月24日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都江東区越中島1丁目3番 関東財務局越中島住宅17-605号

氏 名 井上 圭三

特平11-237003

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[599119293]

1. 変更年月日 1999年 8月24日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区小石川5-35-8-604

氏 名 新井 洋由

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**